

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 2 月 7 日 (07.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/10734 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: G01N 27/327

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/06471

(22) 国際出願日: 2001 年 7 月 26 日 (26.07.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-232385 2000 年 7 月 31 日 (31.07.2000) JP  
特願2000-236131 2000 年 8 月 3 日 (03.08.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下電  
器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUS-  
TRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒571-8501 大阪府門真市  
大字門真1006番地 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長谷川 美  
和 (HASEGAWA, Miwa) [JP/JP]; 〒630-8002 奈良県

奈良市二条町1-1-46-201 Nara (JP).. 山本智浩 (YA-  
MAMOTO, Tomohiro) [JP/JP]; 〒573-0018 大阪府枚方  
市桜丘町45-1-209 Osaka (JP). 渡邊基一 (WATANABE,  
Motokazu) [JP/JP]; 〒576-0034 大阪府交野市天野が原  
4-28-402 Osaka (JP). 池田 信 (IKEDA, Shin) [JP/JP];  
〒576-0022 大阪府交野市藤が尾2-5-16-205 Osaka (JP).  
南海史朗 (NANKAI, Shiro) [JP/JP]; 〒573-0071 大阪  
府枚方市茄子作4-50-12 Osaka (JP).

(74) 代理人: 石井和郎 (ISHII, Kazuo); 〒541-0041 大阪府  
大阪市中央区北浜2丁目3番6号 北浜山本ビル Osaka  
(JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, JP, KR, US.

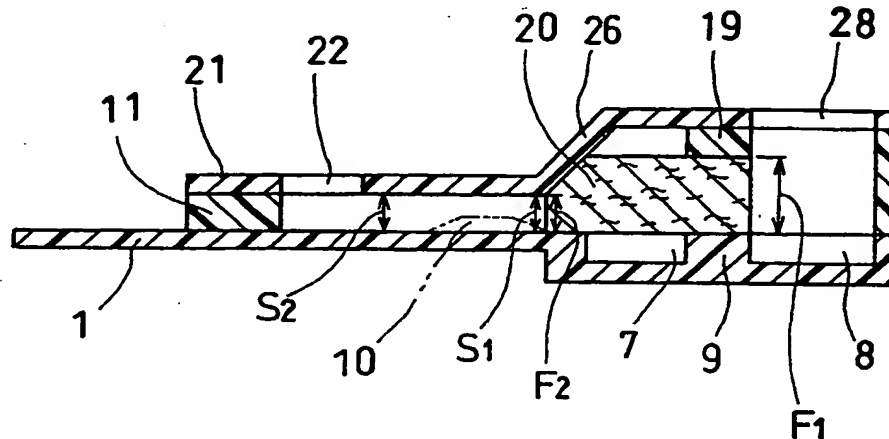
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BIOSENSOR

(54) 発明の名称: バイオセンサ



(57) Abstract: A biosensor capable of measuring all types of bloods by allowing the plasma obtained by filtrating blood corpuscle to rapidly reach an electrode system, comprising an insulating substrate, the electrode system having a measurement electrode and an electrode opposite to the measurement electrode installed on the substrate, a reaction layer at least containing an oxidoreductase and an electronic mediator, a specimen liquid feed path containing the electrode system and the reaction layer, and a specimen feed part, wherein a filter acting to filtrate blood corpuscle and having a cross section larger than that of the opening part of the specimen liquid feed path is installed between the specimen feed path and the specimen liquid feed path, and the plasma obtained by filtrating the blood corpuscle through the filter is sucked into the specimen liquid feed path by a capillarity.

[続葉有]



---

(57) 要約:

本発明は、血球を濾過された血漿が迅速に電極系に達するように改良し、全血を測定対象とするバイオセンサを提供する。このセンサは、絶縁性の基板、基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応層、電極系と前記反応層とを含む試料液供給路、および試料供給部を具備し、試料供給部と試料液供給路との間に、血球を濾過する作用を有し、試料液供給路の開口部より断面積の大きいフィルタを設け、フィルタで血球を濾過された血漿が毛細管現象によって試料液供給路内に吸引されるように構成されている。

## 明 細 書

## バイオセンサ

## 技術分野

本発明は、試料中の特定成分について、迅速、高精度、かつ簡便に定量することができるバイオセンサ、特にコレステロールセンサに関する。

## 背景技術

従来のバイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。

グルコースの定量方法としては、グルコースオキシダーゼと酸素電極または過酸化水素電極とを組み合わせた方式が一般に知られている。グルコースオキシダーゼは、酸素を電子メディエータとして基質であるβ-D-グルコースをD-グルコノ-δ-ラクトンに選択的に酸化する。この反応にともない酸素は過酸化水素に還元される。このときの酸素消費量を酸素電極によって測定するか、または過酸化水素の生成量を白金電極等を用いた過酸化水素電極によって測定することにより、グルコースの定量が行われる。

しかし、上記の方法では、測定対象によっては溶存酸素濃度の影響を大きく受け、また酸素のない条件下では測定が不可能となる。そこで、酸素を電子メディエータとして用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体などの金属錯体や有機化合物を電子メディエータとして用いるタイプのグルコースセンサが開発されている（特開平2-062952号公報）。

このバイオセンサは、絶縁性の基板上にスクリーン印刷等の方法で測

定極、対極および参照極からなる電極系を形成し、この電極系上に、親水性高分子と酸化還元酵素および電子メディエータを含む酵素反応層を形成したものである。この酵素反応層には、必要に応じて緩衝剤が加えられる。

このバイオセンサの酵素反応層上に、基質を含む試料液を滴下すると、酵素反応層が溶解して、酵素と基質が反応し、前記反応に伴い電子メディエータが還元される。酵素反応終了後、この還元された電子メディエータを電気化学的に酸化する酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めることができる。

このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子メディエータの還元体を電極で酸化し、その酸化電流値からグルコース濃度を求めることができる。

このようなバイオセンサは、測定対象物質を基質とする酵素を用いることで、様々な物質に対する測定が原理的には可能である。例えば、酸化還元酵素にコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよびコレステロールエステラーゼを用いれば、各種医療機関で診断指針に用いられる血清中コレステロール値を測定することができる。

コレステロールエステラーゼの酵素反応の進行は非常に遅いので、適切な界面活性剤を添加することにより、コレステロールエステラーゼの活性を向上させ、全体の反応に要する時間を短縮することができる。

しかし、反応系に界面活性剤が含まれることから、界面活性剤が血球に悪影響を及ぼすため、全血による測定は不可能であった。

上記のように、血液中のコレステロール値を測定する場合、反応系に界面活性剤が含まれていることから、界面活性剤が血液中の赤血球に悪影響を及ぼす。それが原因となり、グルコースセンサのように全血その

ものを測定することが不可能となっていた。そこで、赤血球をろ過した血漿のみを迅速にセンサに供給するために、試料液供給路の開口部付近にろ過部を設ける提案がなされている。しかし、ろ過した血漿がセンサ内に流入する速度が遅く、一定ではないことから、応答値がばらつき、また血漿がセンサ内に入る際しばしば気泡が生じ、測定不可能となっていた。

本発明は、上記のような不都合をなくし、血球を濾過された血漿が迅速に電極系に達するように改良したバイオセンサを提供することを目的とする。

本発明は、高精度で応答性が優れ、全血を測定対象とするコレステロールセンサを提供することをも目的とする。

#### 発明の開示

本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応層、前記電極系と前記反応層とを含む試料液供給路、試料供給部、および前記試料供給部と試料液供給路との間に設けられた、血球を濾過するフィルタを具備し、前記フィルタで血球を濾過された血漿が毛管現象によって前記試料液供給路内に吸引されるようにしたバイオセンサであって、前記フィルタは、その一次側の断面積が前記試料液供給路の開口部の断面積より大きいことを特徴とする。

ここに用いるフィルタは、三次元的に連なる空隙部を有する多孔体からなり、この多孔体は毛管作用により血液を前記試料供給部側から試料液供給路側へ移動させるが、血漿と血球との流通抵抗の差により血球を濾過する作用を有する。このフィルタには、ガラス繊維、セルロース、パルプなどの好ましくは親水性の繊維からなる不織布、濾紙、その他の

多孔質体が用いられる。

前記フィルタは、その一次側の断面積が前記試料液供給路の開口部に位置する二次側の断面積と同じかそれより大きいのが好ましい。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は本発明の一実施の形態に係るバイオセンサの縦断面図である。

図 2 は同センサの反応層、スペーサおよびカバーを除いた平面図である。

図 3 は同センサの分解斜視図である。

図 4 は同センサの要部の拡大断面図である。

図 5 はセンサの試料供給部の構成例を示す縦断面略図である。

図 6 はセンサのフィルタの変形例を示す平面略図である。

図 7 はセンサのフィルタの変形例を示す縦断面略図である。

図 8 は本発明の他の実施の形態に係るセンサの縦断面図である。

図 9 は同センサの分解斜視図である。

図 10 はセンサのフィルタの変形例を示す縦断面略図である。

図 11 は比較例のセンサの縦断面図である。

図 12 は同センサの平面図である。

図 13 は本発明の実施例および比較例のコレステロールセンサの応答特性を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

上記のように、本発明は、妨害物質である血球を、フィルタにより除去し、速やかにセンサの電極系へ血漿を流入させるようにしたものである。すなわち、電極系および反応層を含む試料液供給路と試料供給部との間に、血球を濾過する作用を有し、一次側の断面積が前記試料液供給

路の開口部の断面積より大きいフィルタを設け、これによってフィルタで血球を濾過された血漿が毛管現象によって前記試料液供給路内に吸引されるようにするものである。

本発明の好ましい実施の形態において、試料液供給路は、前記基板とこれに組み合わされたカバー部材との間に形成される。

本発明の他の好ましい実施の形態において、前記カバー部材の少なくとも前記フィルタおよび試料液供給路を覆う部分は透明である。

血球を分離された血漿を速やかに電極系へ導入させるには、さらに次のいずれかの条件を満たすことが好ましい。

1) 試料液供給路の断面積は、試料液供給路の開口部の断面積と等しいかそれより小さい。

2) フィルタは、その電極側の端部の断面積が、試料液を導入する側、すなわち一次側の断面積と同じかそれよりも小さくなっている。

3) フィルタは、その膨張が妨げられないように、支持体に保持されている。

つまり、フィルタの試料供給部に面する一次側から、試料液供給路の終端に開口する空気孔側にかけて、試料液が流れる部分のセンサ内中空部およびフィルタの断面積が徐々に小さくなっている構造が最も好ましい。

フィルタの電極側先端の断面積が小さい例として、フィルタ全体の形状が凸型、円錐、台形などであるものがある。

フィルタ先端の断面積が小さいとは、フィルタの電極側先端部分を支持している部分が試料液供給路にかけて狭くなっていることである。

妨害物質である血球を完全に除去するためには、試料液が、フィルタを必ず通過するように、フィルタはその試料供給部から試料液供給路までの領域の範囲において、フィルタ支持部と非接触の箇所、すなわちフ

フィルタの表面を一回りする空隙部が1箇所以上あることが好ましい。これがないと、フィルタを通過せずフィルタ支持部を伝った血球が電極系へ流入する可能性がある。

また、フィルタの二次側の断面積が一次側の断面積より小さい場合と、フィルタの一次側から二次側までの断面積が同じ場合とを比較すると、前者は血球分離位置がより一次側である。そして、後者では、血球分離位置がより二次側であるため、試料液供給路内に血球が混入する場合がある。

これらの構成や形状により、試料液中の妨害物質を除去し、速やかにセンサ内に血漿を流入させることが可能である。

フィルタの電極側先端と電極の位置関係については、フィルタは電極とは非接触であることが好ましい。

ろ過部と電極式バイオセンサの接続位置は、通常、試料液供給路の開口部側に位置するのがよいが、省スペース化として、空気孔側に位置していてもよい。この場合は、試料液供給路の開口部が空気孔の役割をする。

カバーおよびスペーサなどのフィルタ支持部は、透明であることが好ましい。なぜなら、フィルタにより試料液がろ過される工程、およびろ過された試料液が毛細管現象によって試料液供給路の内部に吸引される工程を目視できることにより、ろ過が成功しているかどうかを確認することができるからである。

電子メディエータとしては、フェリシアン化カリウムその他、コレステロールオキシダーゼなどの酸化還元酵素との電子伝達能を有するレドックス化合物から選択して用いることができる。

用いる酸化還元酵素は、測定対象物質を基質とする酵素であり、グルコースを測定対象とするセンサでは、グルコースオキシダーゼを用いる。



診断指針に用いられる血清中のコレステロール値を測定するには、コレステロールの酸化反応を触媒する酵素コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼとコレステロールエステルをコレステロールに変化させる過程を触媒する酵素コレステロールエステラーゼを用いる。コレステロールエステラーゼの酵素反応の進行は非常に遅いので、適切な界面活性剤を添加することにより、コレステロールエステラーゼの活性を向上させ、全体の反応に要する時間を短縮することができる。これらは、センサ内の電極系上またはその近傍の位置に配置する。電極系を設けた基板に組み合わされて基板との間に電極系に試料液を供給する試料液供給路を形成するカバー部材を有するセンサでは、前記試料液供給路に露出する部分や試料液供給路の開口部などに設けることができる。いずれの位置であっても、導入された試料液によって反応試薬層が容易に溶解して電極系に到達できることが好ましい。電極を保護し、形成される反応層の剥離を抑制するために、電極系上に接して親水性高分子層が形成されることが好ましい。また、電極系以外でも、反応層を形成する際の下地として親水性高分子層が形成されるか、最下層の反応層に親水性高分子が含まれることが好ましい。

電子メディエータを含む層は、溶解性を高めるために、界面活性剤と分離することが好ましい。また、保存安定性のために、コレステロールの酸化反応を触媒する酵素コレステロールエステラーゼと分離することが好ましい。

血糖値を測定するバイオセンサでは、試料液が反応層へ導入されるのを容易にするため、電極系上に形成された層などを被覆するように、脂質を含む層を形成する例がある（たとえば特開平2-062952号公報）。本発明のコレステロールを測定するバイオセンサでは、界面活性剤が含まれ、これが脂質と同様の役割も果たすため、脂質層はなくても

よい。

親水性高分子としては、水溶性セルロース誘導体、特にエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロースの他、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ゼラチン、ポリアクリル酸およびその塩、デンプンおよびその誘導体、無水マレイン酸の重合体およびその塩、ポリアクリルアミド、メタクリレート樹脂、ポリ-2-ヒドロキシエチルメタクリレートなどを用いることができる。

界面活性剤には、n-オクチル-β-D-チオグルコシド、ポリエチレングリコールモノドデシルエーテル、コール酸ナトリウム、ドデシル-β-マルトシド、ジュークローズモノラウレート、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、N, N-ビス(3-D-グルコンアミドプロピル)デオキシコールアミドおよびポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルから選択することができる。

脂質としては、使用する場合、レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質で、両親媒性脂質が好適に用いられる。

酸化電流の測定方法としては、測定極と対極のみの二電極方式と、参照極を加えた三電極方式があり、三電極方式の方がより正確な測定が可能である。

以下、具体的な実施の形態により本発明を詳細に説明する。

図1は一実施の形態に係るバイオセンサの縦断面図、図2はその反応層、スペーサおよびカバーを除いた平面図、図3は反応層およびフィルタを除いたバイオセンサの分解斜視図である。

1はポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板を示す。この基板1は、左半分1aは厚みが薄く、右半分1bは左半分の約2倍の厚みを有する。厚みの薄い方の部分1aには、スクリーン印刷により銀べ

ーストを印刷してリード 2、3 および電極系の下地を形成してある。基板 1 上には、さらに樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷することにより、測定極 4 と対極 5 を含む電極系を形成している。また、特定の領域に絶縁性ペーストを印刷することにより絶縁層 6 を形成してある。絶縁層 6 は、測定極 4 および対極 5 の露出部分の面積を一定とし、かつリード 2 および 3 を部分的に覆っている。基板 1 の厚みの厚い部分 1 b には、上面に開口する凹部 7 および 8 が設けられている。

前記の基板 1 に組み合わせるスペーサ 11 は、基板 1 の絶縁層 6 をほぼ覆う大きさの平板部 11 a と、基板の部分 1 b の周縁部を覆って基板 1 上に後述するフィルタを収容する空間部を形成するための、高さの高い略 U 字部 11 b とからなる。U 字状部 11 b は、左端部 16 には順次高さが低くなるようにテーパをつけて、平板部 11 a に連なる部分は平板部と同じ高さになるようにしている。U 字状部 11 b は、さらに、基板 1 の凹部 7 と 8 との間の仕切部 9 に対応する部分の上方に、フィルタを押さえる押さえ部 19 を有する。平板部 11 a は、上下に貫通し、U 字状部側に開放したスリット 12 を有する。

カバー 21 は、それぞれスペーサ 11 の平板部 11 a および部分 11 b を覆う部分 21 a および 21 b を有し、部分 21 b には、スペーサのテーパ部 16 に対応させて傾斜した部分 26 を有する。カバー 21 は、さらに基板 1 のスリット 12 の終端に連通する空気孔 22、および、凹部 8 と、スペーサ 11 の押さえ部 19 の右方の開放部 18 とに連通する透孔 28 を有する。

基板 1 上および／またはカバー 11 側に反応試薬層を形成し、さらに基板 1 上にフィルタ 20 をセットして、スペーサ 11 およびカバー 21 を基板 1 に組み合わせることによって、図 1 に示すようなバイオセンサが作成される。図 1 において、10 は電極系を示す。フィルタ 20 は、

後端の上下が基板 1 の仕切部 9 とカバー 2 1 の押さえ部 1 9 によって、また前端部が基板 1 の試料液供給路の開口部に連なる部分とカバー 2 1 の傾斜部 2 6 によってそれぞれ挟まれて固定される。そして、フィルタ 2 0 は、その先端がスペーサ 1 1 のスリット 1 2 の部分に形成された試料液供給路内に臨んでいる。

このように固定されたフィルタ 2 0 は、基板 1 の凹部 7 上に位置する部分は、その周囲が一回り分基板やカバー部材に接触していない。このように、フィルタ 2 0 の一部がフィルタ支持部と非接触の箇所、すなわちフィルタを一回りする空隙部があることにより、フィルタを通過せずにフィルタ支持部を伝わって血球が電極系へ流入するのを阻止することができる。

図 1 及び図 2 において、F 1 はフィルタ 2 0 の一次側の断面積を表し、F 2 はフィルタ 2 0 の試料液供給路の開口部に位置する二次側の断面積を表す。また、S 1 は試料液供給路の開口部の断面積を表し、S 2 は試料液供給路の断面積を表す。

本発明においては、 $S 1 < F 1$  とする。これによって血球を濾過された血漿が迅速に電極系に達する。好ましくは  $S 2 \leq F 1$  である。より好ましくは  $F 2 \leq F 1$  である。

このセンサを用いて血液中のコレステロール値を測定するには、試料の血液をカバー 2 1 の透孔 2 8 の部分から基板 1 の凹部 8 上に供給する。ここに供給された血液は、フィルタ 2 0 の端部からその内へ浸透する。フィルタ 2 0 内では、血球の浸透速度は液体成分である血漿より遅いので、血漿がフィルタの電極系側の端部から浸み出す。そしてこの浸み出した血漿は、酵素等からなり、電極系を覆う位置またはその直上のカバー裏面に担持された反応試薬を溶解しながら電極系近傍から、さらに空気孔 2 2 の部分までの試料液供給路全体を満たす。試料液供給路全体が

液体で満たされると、フィルタ 20 内の液体の流動も停止し、その時点で、血球はフィルタ 20 の電極系側の端部に到達せず、その位置に留め置かれる。従って、フィルタ 20 は、血漿が試料液供給路全体を満たすだけの量が通過してなお血球がフィルタの二次側に達しない程度に、血漿と血球との流通抵抗の差があるように設計される。本発明のフィルタは、平均孔径約  $1 \sim 7 \mu\text{m}$  程度のデプスフィルタが好適である。

このような、血球濾過の過程を経て、血漿により溶解された反応試薬層と血漿中の測定成分、コレステロールセンサであればコレステロール、との化学反応が生じ、一定時間経過後、電極反応により電流値を測定し、血漿中の成分を定量することができる。図 4 は、試料液供給路の電極系近傍における反応試薬層の配置の例を示す。基板 1 の電極系上には、親水性高分子のカルボキシメチルセルロースのナトリウム塩（以下単に CMC で表す）の層 30、および反応試薬の例えば電子メディエータを含む層 31a が形成してある。また、カバー 21 にスペーサ 11 を組み合わせたカバー部材の裏面には、試料液供給路に露出する面に、界面活性剤の層 32 と酸化還元酵素を含む反応試薬層 31b が形成されている。

図 5、6 および 7 は、センサの変形例を略図で示している。

図 5 は、試料供給部の異なる例を示している。図 5 (a) は、図 1 のように、試料供給部 8 が試料液を受容するような凹部で構成されている。図 5 (b) は、フィルタ 20 の端部上面が露出し、そこに試料液を添加するようにした試料供給部 8 を有する例である。図 5 (c) は、フィルタ 20 の一次側端面および端部上面が露出している。従って、基板 1 上の試料供給部 8 のみでなく、フィルタ 20 の端部上面へ試料を添加してもよい。

図 6 は、フィルタの種々の形状を示す平面図である。図 6 (a) は、一次側から二次側まで同じ幅のフィルタの例である。図 6 (b) は、一

次側から二次側に順次幅が狭くなるようにテーパを付したもので、略台形である。図 6 (c) は、一次側の幅が二次側幅より広くなるように途中で幅を変えた例である。

図 7 は、フィルタの断面形状が異なる例を示す。図 7 (a) ないし (c) は、一次側の断面を二次側の断面より大きくなるようにテーパを付したものである。図 7 (d) および (e) は、一次側および二次側とも同じ断面となるようにしたものである。

上記図 1 および図 5 ~ 7 に示すように、試料液供給路を構成するスリット 1 2 の液が流通する方向に垂直な断面積は、いずれもフィルタ 2 0 の断面積に比べて小さくしてある。そして、フィルタ 2 0 は、その全体がほぼ均一な密度を有するものとしてある。このように本発明は、試料液供給路の断面積  $S_2$  をフィルタ 2 0 の一次側の断面積  $F_1$  より小さくすることにより、フィルタで血球を濾過された血漿が毛管現象によって試料液供給路内に迅速に吸引されるようにするものである。フィルタ先端の断面積を小さくすることにより、速やかにセンサ内に血漿を流入させることが可能となる。

図 5 に示す試料供給部と、図 6 に示すフィルタの平面形状および／または図 7 に示すフィルタの断面形状とを組み合わせただけの場合でも、速やかに血漿を試料供給路内に流入させることができるようになる。

図示のような構造のバイオセンサでは、フィルタの一次側の幅は 5 mm 以下、厚さは 2 mm 以下が好ましい。試料液供給路の開口部の幅は 2 mm 以下、厚さは 200  $\mu$ m 以下が好ましい。

図 8 は、本発明のさらに他の実施形態に係るバイオセンサの縦断面図、図 9 はその試薬層を除いた分解斜視図である。

絶縁性基板 3 1 上には、図 1 の場合と同様にして、リード 3 2 および 3 3、それぞれのリードに接続された作用極 3 4 および対極 3 5、なら

びに絶縁層 3 6 が形成されている。この基板 3 1 上には、複数のスペーサ 4 1、4 3、4 5、4 7 および 4 9、ならびにカバー 5 3 が組み合わされ、スペーサ 4 3 とカバー 5 3 との間には、透孔 4 6、4 8 および 5 0 の部分にフィルタ 5 1 がセットされている。カバー 5 2 の透孔 5 3 が試料供給部を構成し、スペーサ 4 1 および 4 3 に設けられた透孔 4 2 および 4 4 が試料液供給路を構成している。スペーサ 4 5 および 4 9 の透孔 4 6 および 5 0 は、その径をフィルタ 5 1 の径より大きくしているので、フィルタ 5 1 の周囲には、5 5 および 5 6 で表すように、フィルタ 5 1 を囲む空隙部が形成される。スペーサ 4 7 は、フィルタ 5 1 の外周と部分的に接し、フィルタを位置決めする役割をしている。スペーサ 4 1 は、前記の試料液供給路の終端部側を大気に開放するための一对の空気孔 5 4 を有する。かくして試料供給部となる透孔 5 3 から電極系に至るフィルタ 5 1 および試料液供給路には毛管現象により試料液が導入され、フィルタ 5 1 で濾過された血漿が電極系に到達すると、試料液の移動は停止するようになる。

ここで、フィルタ 5 1 を囲む空隙部 5 5 および 5 6 の高さを定めるスペーサ 4 9 および 4 5 の厚みは 1 0 0  $\mu$ m 以上であることが好ましい。スペーサ 4 1 は、その透孔 4 2 の部分が試料液と試薬との反応の場を提供するものであり、スペーサ 4 1 の厚みは 2 0 0  $\mu$ m 以下が好ましい。

この例では、電極系上に、CMC 層 6 1 および電子メディエータ層 6 2 が形成され、スペーサ 4 3 の裏面に酵素と界面活性剤を含む層 6 3 が形成されている。

図 1 0 は、前記のように、カバー側に設けた試料供給部から電極系に向けて、試料液を重力方向に供給するセンサにおけるフィルタの形状の例を示す。図 1 0 (a) は、図 8 のように、一次側および二次側が同じ断面をもつフィルタ 5 1 を用いる例である。図 1 0 (b) は、二次側の

断面積を一次側の断面積より小さくした例である。

以下、本発明の実施例を説明する。

#### 実施例 1

図 1 ～ 4 の構成を有するコレステロールセンサで、反応層 3 1 a が電子メディエータを含み、反応層 3 1 b がコレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、および界面活性剤を含み、層 3 2 が界面活性剤からなる。このセンサの作製手順を以下に示す。

まず、基板 1 の電極系上に、カルボキシメチルセルロースのナトリウム塩の 0.5 wt % 水溶液を 5  $\mu$  l 滴下し、50℃の温風乾燥器中で 10 分間乾燥させることにより CMC 層 3 0 を形成した。次に、フェリシアン化カリウム水溶液 4  $\mu$  l (フェリシアン化カリウム 70 mM 相当) を CMC 層 3 0 上に滴下し、50℃の温風乾燥器中で 10 分間乾燥させることにより、フェリシアン化カリウムを含む反応層 3 1 a を形成した。

界面活性剤であるポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (T r i t o n X - 1 0 0) の 2 wt % エタノール溶液を、カバーとスペーサを組合せたカバー部材のスリットにより形成される凹部に 2  $\mu$  l 滴下し、室温で 3 分間乾燥させることにより界面活性剤層 3 2 を形成した。前記スリットの幅は 2 mm、長さ 4.5 mm であり、スペーサの厚みは 100  $\mu$  m である。

ノカルジア由来のコレステロールオキシダーゼ (E C 1. 1. 3. 6、以下 C h O D と略す) とシュードモナス由来のコレステロールエステラーゼ (E C. 3. 1. 1. 13、以下 C h E と略す) を溶解した水溶液に、界面活性剤であるポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (T r i t o n X - 1 0 0) を添加した。この混合水溶液を、界



面活性剤層 3 2 上に  $1.5 \mu\text{l}$  滴下し、 $-196^\circ\text{C}$  の液体窒素にて凍結後、梨型フラスコ内に収納して凍結乾燥器中で一晩乾燥させることにより、 $480$  ユニット (U) /  $\text{ml}$  のコレステロールオキシダーゼ、 $1200$  U /  $\text{ml}$  のコレステロールエステラーゼおよび  $2 \text{ wt} \%$  の界面活性剤を含む反応層 3 1 b を形成した。

こうして作製したセンサの基板 1 上に、上辺  $2 \text{ mm}$ 、下辺  $4 \text{ mm}$ 、高さ  $3 \text{ mm}$  の台形に打ち抜いた厚さ  $600 \mu\text{m}$ 、平均孔径  $2.3 \mu\text{m}$  のガラス繊維濾紙を、作用極に接触しないように、図 2 のように設置した。

この後、前記のカバー部材を基板に接着することにより、図 1 のコレステロールセンサを作製した。

#### 比較例 1

図 1 1 および図 1 2 に示すように、フィルタ 2 0' の寸法を幅  $2 \text{ mm}$ 、長さ  $27 \text{ mm}$ 、厚さ  $100 \mu\text{m}$  とした他は実施例 1 と同様のコレステロールセンサを組み立てた。

実施例 1 および比較例 1 のコレステロールセンサ A および B に、試料液として全血  $20 \mu\text{l}$  を試料液導入口となるカバー 2 1 の透孔 2 8 より基板 1 の凹部 8 上に導入し、3 分後に対極を基準にして測定極にアノード方向へ  $+0.5 \text{ V}$  のパルス電圧を印加し、5 秒後に作用極と対極との間に流れる電流値を測定した。その結果を図 1 3 に示す。実施例 1 および比較例 1 のセンサのフィルタの見掛けの体積は、いずれも約  $5.4 \text{ mm}^3$  である。

図から明らかなように、本発明のセンサによれば、コレステロール濃度と応答値との間に良好な直線性が得られる。

### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、妨害物質である血球を、フィルタにより除去し、しかも迅速に電極系へ供給することができ、応答特性の優れた電気化学的バイオセンサを提供することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 絶縁性の基板、前記基板上に設けられた測定極と対極を有する電極系、少なくとも酸化還元酵素と電子メディエータを含む反応層、前記電極系と前記反応層とを含む試料液供給路、試料供給部、および前記試料供給部と試料液供給路との間に設けられた、血球を濾過するフィルタを具備し、前記フィルタで血球を濾過された血漿が毛管現象によって前記試料液供給路内に吸引されるようにしたバイオセンサであって、前記フィルタは、その一次側の断面積が前記試料液供給路の開口部の断面積より大きいことを特徴とするバイオセンサ。
2. 前記試料液供給路の断面積は、試料液供給路の開口部の断面積と等しいかそれより小さい請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
3. 前記フィルタは、その一次側の断面積が前記試料液供給路の開口部に位置する二次側の断面積より大きい請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
4. 前記フィルタは、三次元的に連なる空隙部を有する多孔体からなり、この多孔体は毛管作用により血液を前記試料供給部側から試料液供給路側へ移動させるが、血漿と血球との流通抵抗の差により血球を濾過する作用を有する請求の範囲第1～3項のいずれかに記載のバイオセンサ。
5. 前記フィルタの試料供給部から試料液供給路までの領域において、フィルタの表面を一回り囲む空隙部を有する請求の範囲第1～4項のいずれかに記載のバイオセンサ。
6. 前記フィルタの二次側の先端が電極と非接触である請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
7. 前記試料液供給路が、前記基板とこれに組み合わされたカバー部材との間に形成された請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

8. 前記カバー部材の少なくとも前記フィルタおよび試料液供給路を覆う部分が透明である請求の範囲第7項記載のバイオセンサ。

9. 前記カバー部材に界面活性剤が担持または固定化されている請求の範囲第7項記載のバイオセンサ。

FIG. 1

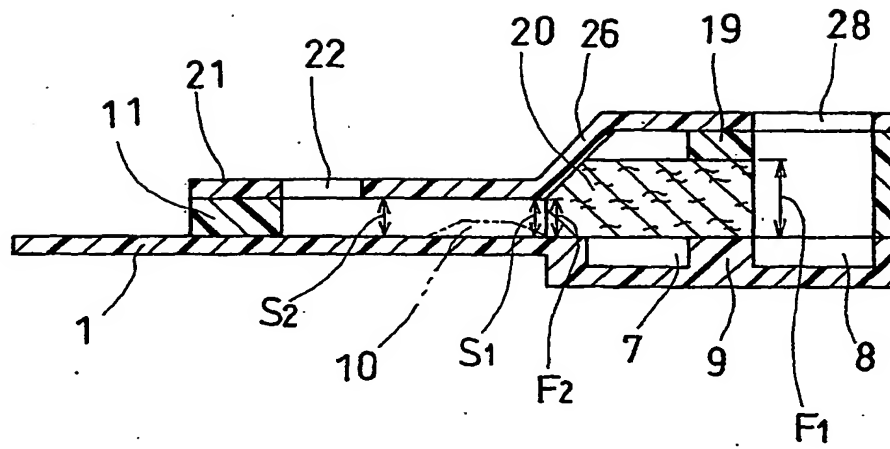


FIG. 2

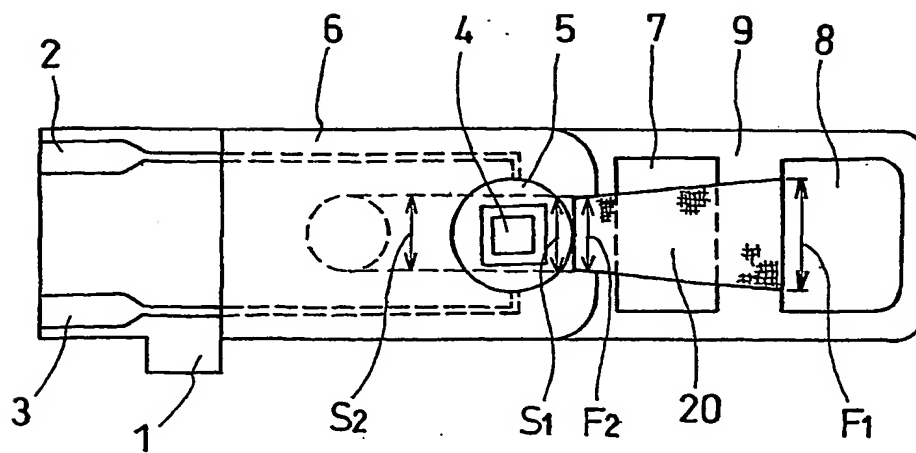


FIG. 3

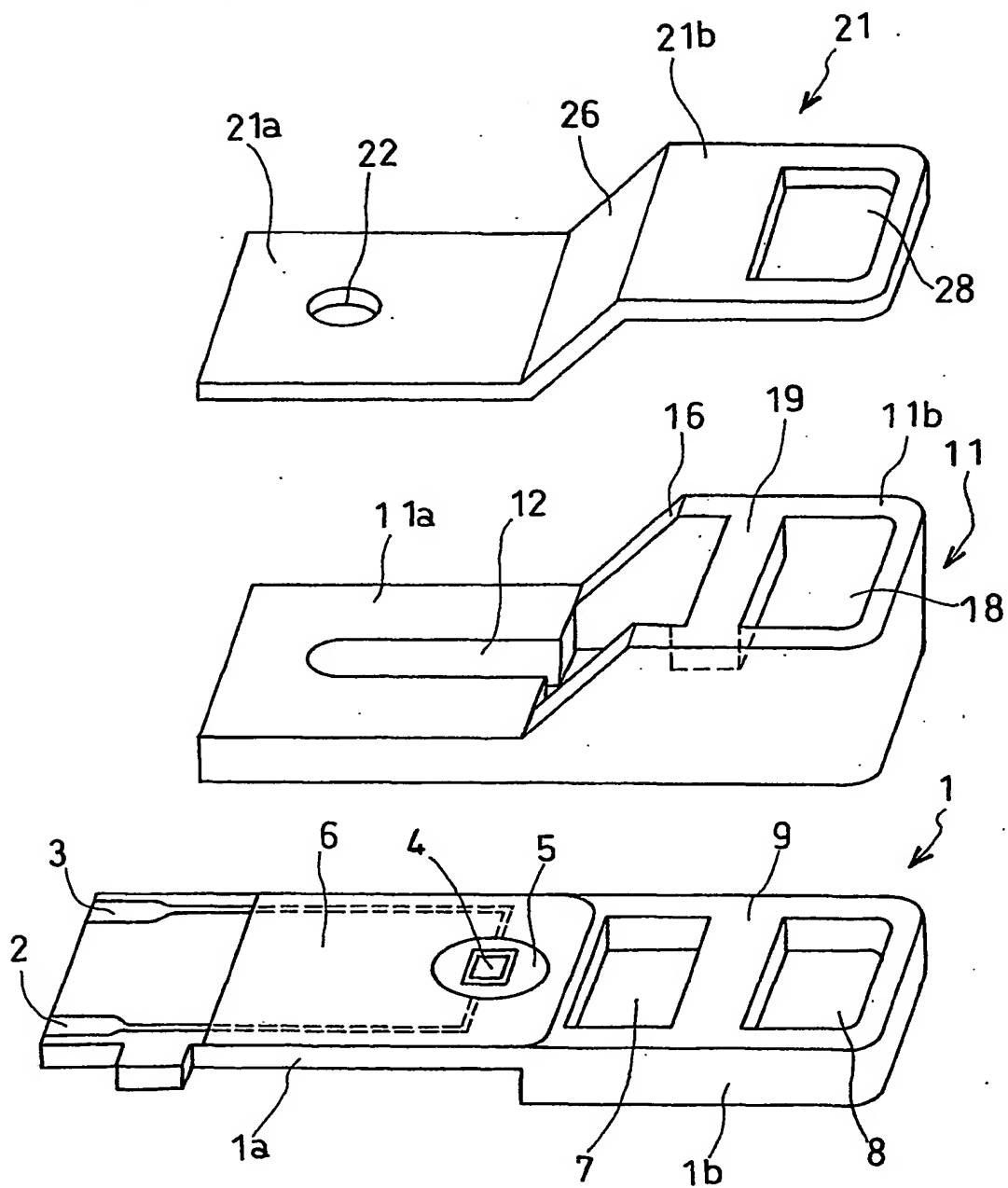
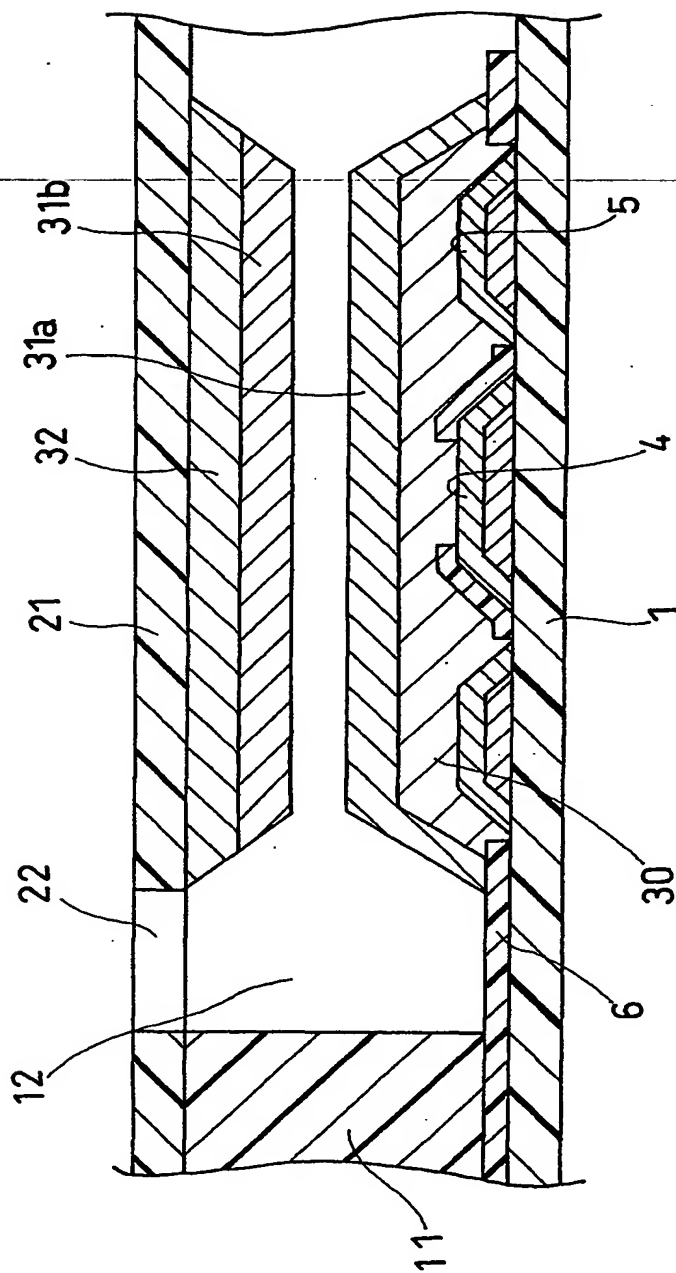


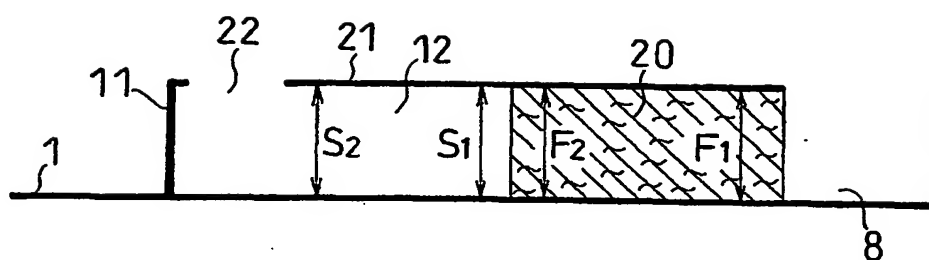
FIG. 4



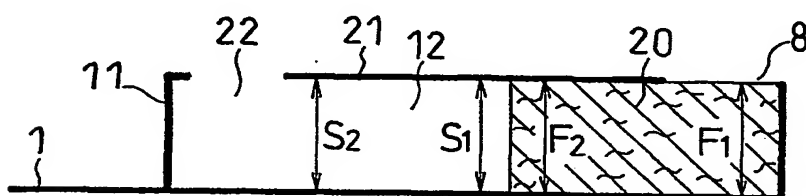
4/11

FIG. 5

(a)



(b)



(c)

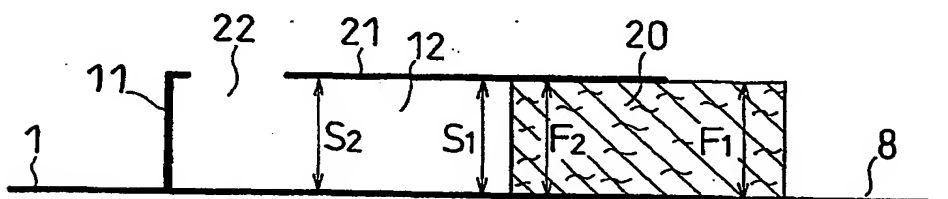
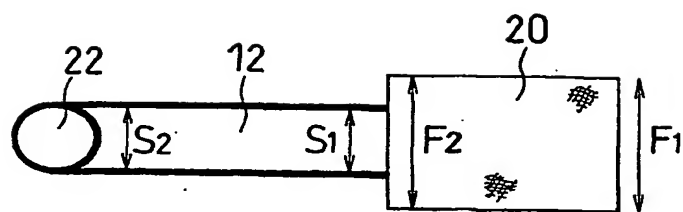


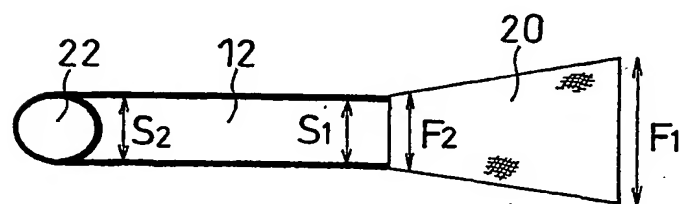


FIG. 6

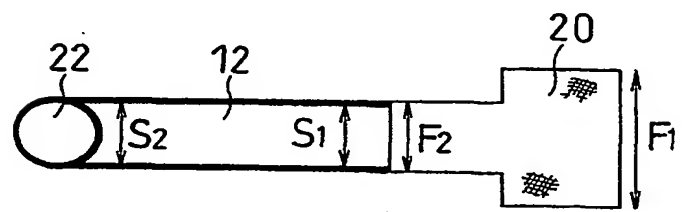
(a)



(b)



(c)



6/11

FIG. 7

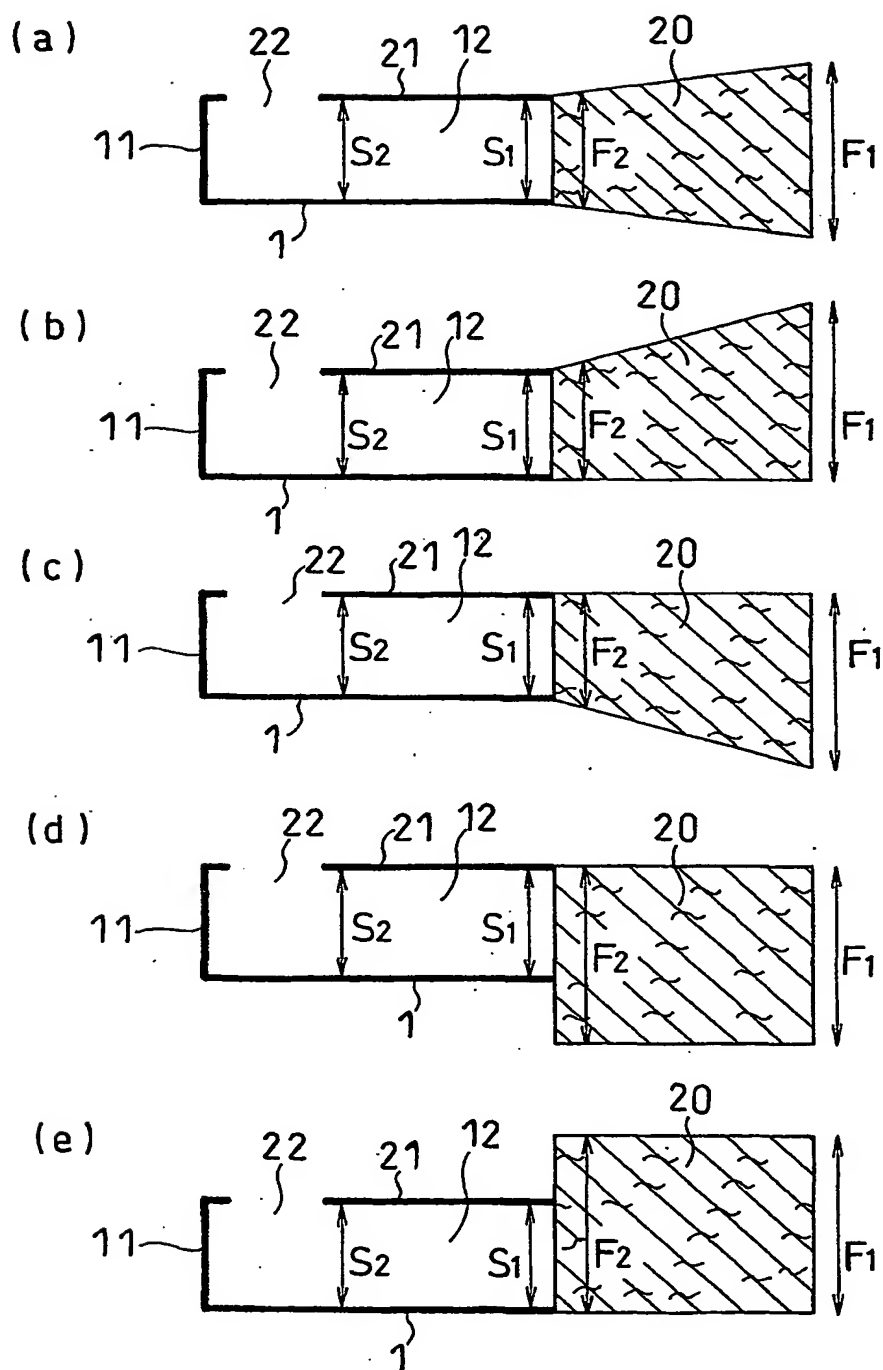
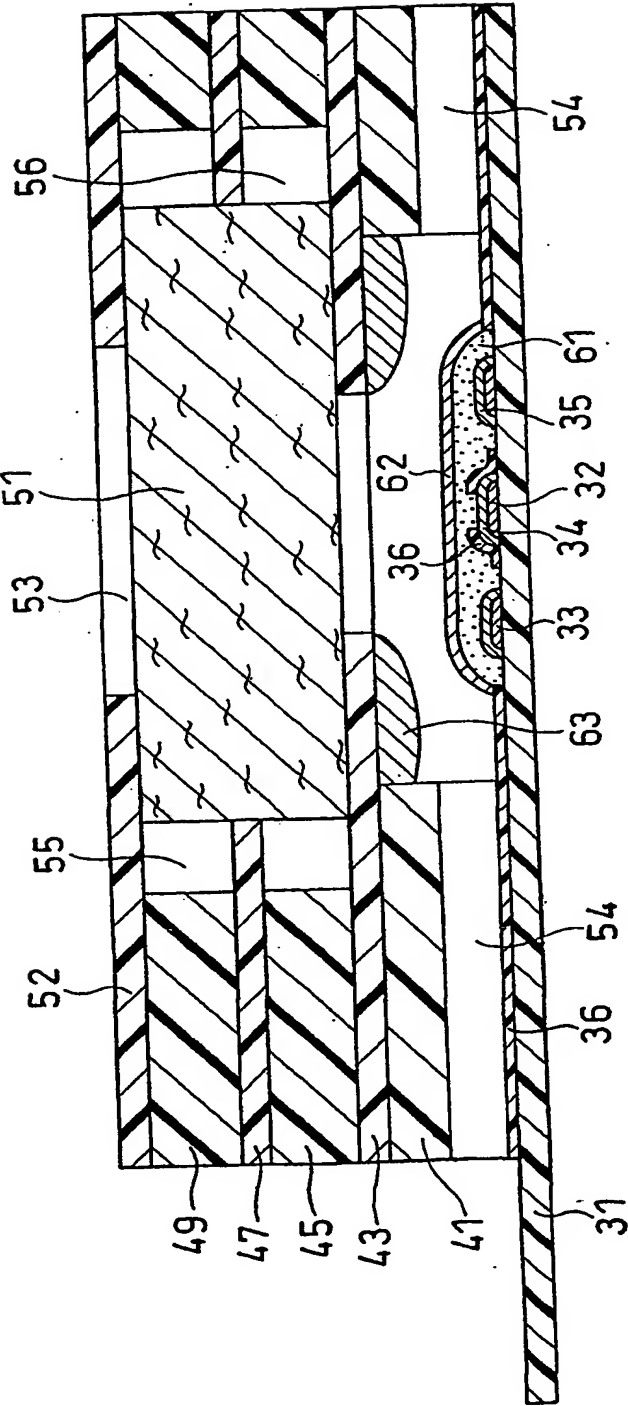
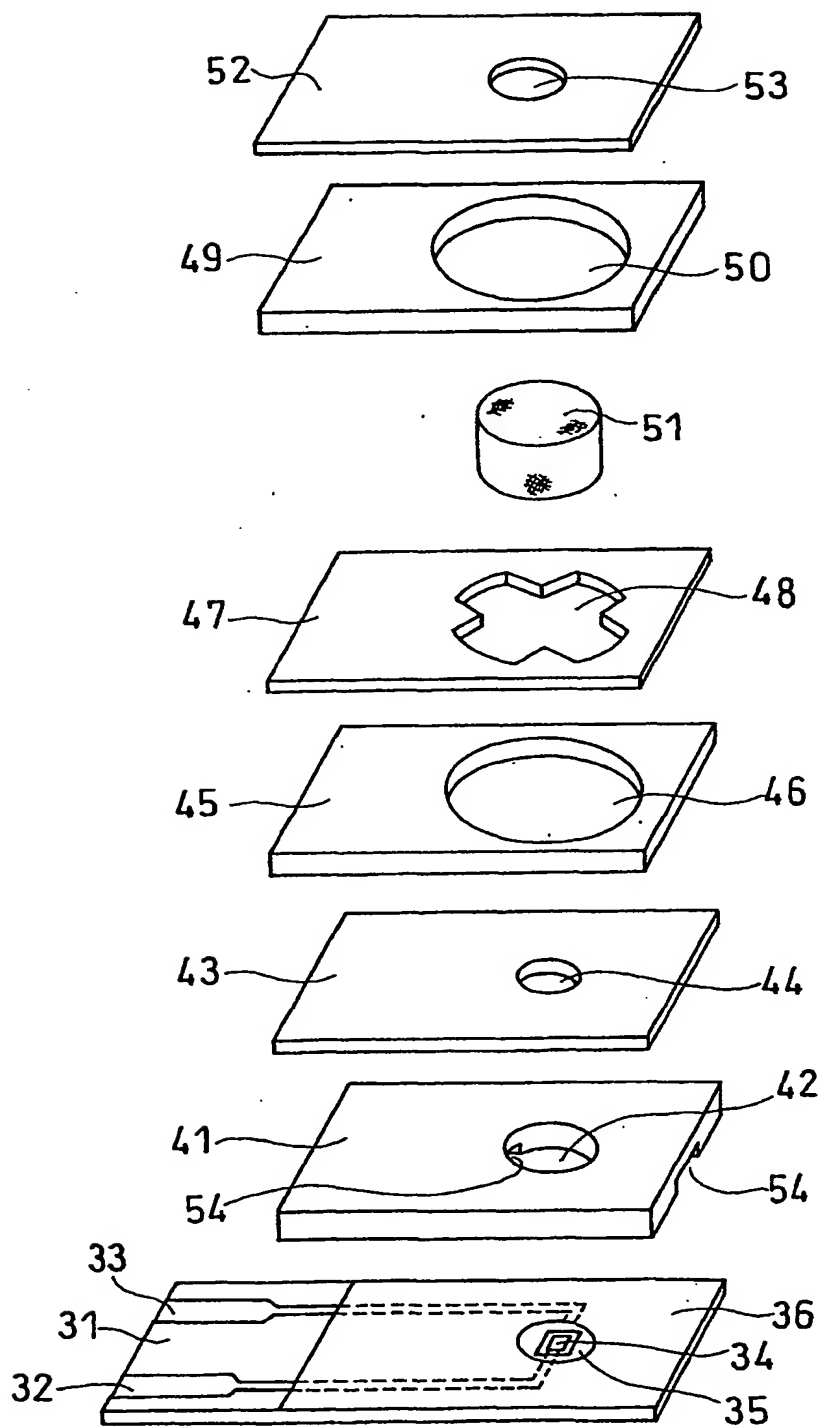


FIG. 8



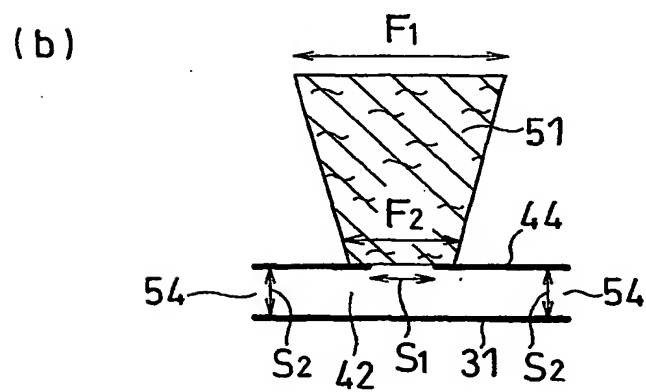
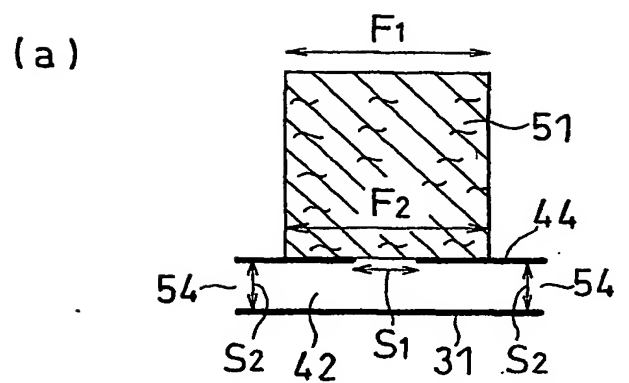
8/11

FIG. 9



9/11

FIG. 10



10/11

FIG. 11

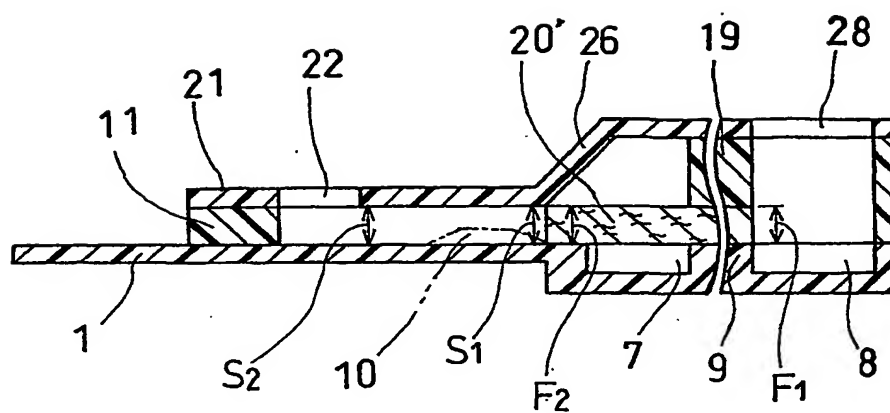
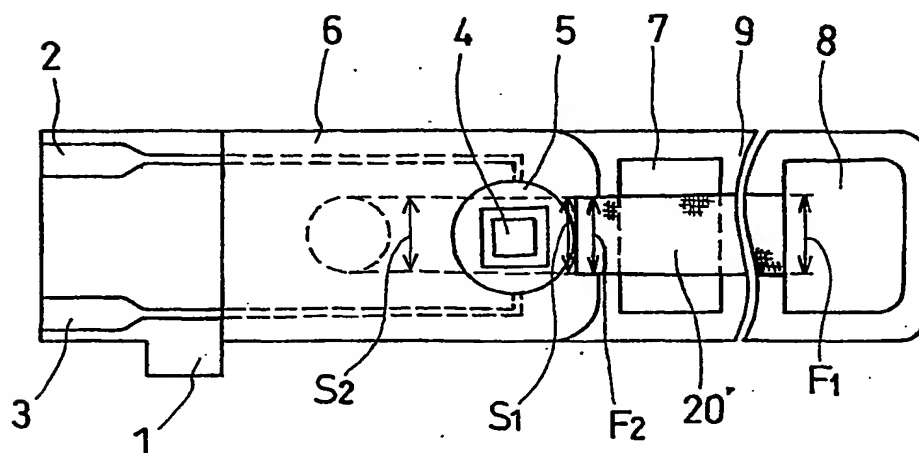
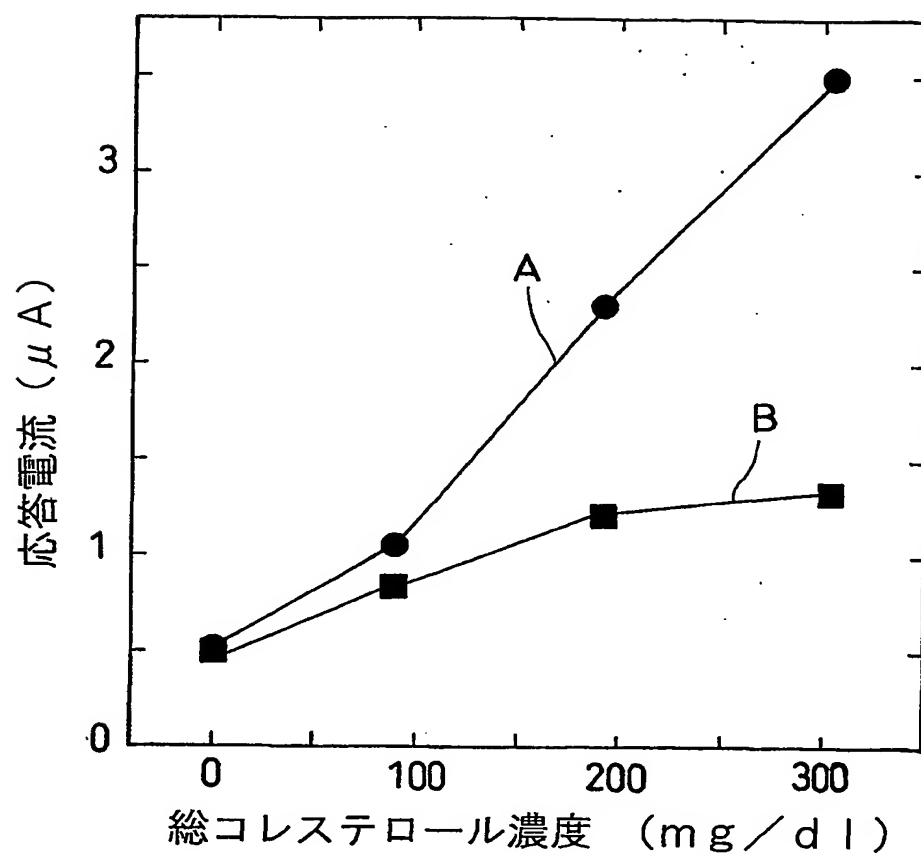


FIG. 12



11/11

FIG. 13



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>7</sup> G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N27/327

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2001
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2001	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS) enzyme\* (electrode+sensor?)\*filter? (in Japanese)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 5609749 A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 March, 1997 (11.03.97), column 19, line 50 to column 23, line 6; Fig. 2 column 19, line 50 to column 23, line 6; Fig. 2 & EP 663446 A2 & JP 7-234201 A	1, 2, 4, 6, 7 3, 5, 8, 9
A	US 4477575 A1 (Boehringer Mannheim GmbH), 16 October, 1984 (16.10.84), Full text & EP 45476 A1 & JP 8-54387 A	1-9
A	JP 9-318588 A (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.), 12 December, 1997 (12.12.97), Full text (Family: none)	1-9
A	JP 63-58149 A (Matsushita Electric Ind. Co., Ltd.), 12 March, 1988 (12.03.88), Full text (Family: none)	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"B" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 September, 2001 (14.09.01)	Date of mailing of the international search report 02 October, 2001 (02.10.01)
--	---

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N27/327

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N27/327

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2001年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2001年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2001年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST (JOIS) コウ\* (デ・ンキョク+セサ?) \*ファイル?

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	US 5609749 A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.) 11. 3月. 1997 (11. 03. 97) 第19カラム第50行~第23カラム第6行, 第2図 第19カラム第50行~第23カラム第6行, 第2図 & EP 663446 A2, JP 7-234201 A	1, 2, 4, 6, 7 3, 5, 8, 9
A	US 4477575 A1 (Boehringer Mannheim GmbH) 16. 10月. 1984 (16. 10. 84) 全文 & EP 45476 A1, JP 8-54387 A	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 09. 01

国際調査報告の発送日

02.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

黒田 浩一



2J

3010

電話番号 03-3581-1101 内線 3250